茶树 *CsPLK* 基因的鉴定与表达分析

陈星星[1]，夏莹[1]，黄龙全[1*]，张剑韵[2]

1.安徽农业大学茶与食品科技学院，合肥 230036；2.安徽农业大学外国语学院，合肥 230036

摘要：茶树中富含茶氨酸、儿茶素和咖啡碱等重要功能成分，具有较高的价值功效。茶树在生命周期中经常遭受逆境胁迫，VB_6在植物体内参与逆境应答，吡哆醛激酶（PLK，pyridoxal kinase）是维生素 B_6（VB_6）补救途径中的关键酶。为进一步了解 *PLK* 在茶树生物合成的功能和作用机理，本研究基于茶树基因组数据库，以龙井 43 为材料，采用逆转录 PCR(RT-PCR)的方法从茶树中克隆出 *CsPLK* 的基因。该基因序列长为 1179 bp，编码 393 个氨基酸。CsPLK 蛋白和已知物种中 PLK 蛋白具有较高的同源性，都是核糖激酶超家族成员。通过构建 *pET-CsPLK* 载体进行原核表达，并鉴定出重组蛋白有很强的催化活性。组织表达特异性分析表明，叶中的表达量比茎、根的高，在根中最低。荧光定量 PCR 表示，低温诱导 *CsPLK* 上调表达，干旱诱导 *CsPLK* 下调表达，发现该基因在茶树中有明显的逆境应答，推测 *CsPLK* 在茶树的生长发育、逆境胁迫发挥重要作用。

关键词：茶树，基因鉴定，逆境胁迫，组织特异性

中图分类号：S571.1　　　　文献标识码：A

Identification and expression analysis of *CsPLK* gene in tea plant

CHEN Xingxing[1]，XIA Ying[1]，HUANG Longquan[1*]，ZHANG Jianyun[2]

（1. *School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University*, Hefei 230036; 2. *School of Foreign Languages, Anhui Agricultural University*, Hefei 230036）

Abstract: The tea plant is rich in important functional ingredients such as theanine, catechin and caffeine, with high value and efficacy. Tea plants are often subjected to stress in their life cycle, and VB_6 is involved in the stress response in plants, Pyridoxal kinase (PLK) is a key enzyme in the vitamin B_6 (VB_6) salvage pathway. In order to further understand the function and mechanism of *PLK* in tea plant biosynthesis, this study based on the tea plant genome database, and using longjing 43 as material, the *CsPLK* gene was cloned from tea plant by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The sequence of *CsPLK* was 1179 bp in length, encoding 393 amino acids. *CsPLK* protein and PLK protein of known species have high homology, both are members of the ribokinase superfamily. The *pET-CsPLK* vector was constructed for prokaryotic expression, and the recombinant protein was identified to have strong catalytic activity, indicating that the gene cloned from tea tree is PL kinase. Tissue expression specificity analysis showed that the expression level in

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No. 31670297）[Supported by the National Natural Science Foundation of China] 。

作者简介：陈星星（1992 年 11 月-），女，安徽省桐城，硕士研究生，从事维生素 B_6代谢转换研究，（E-mail）xxchen1118@163.com。

***通信作者：**黄龙全，博士，教授，从事维生素 B_6代谢和生物多样性研究，（E-mail）Email lqhuang218@aliyun.com。

leaves was higher than that in stems and roots, and lowest in roots. Real-time PCR showed that CsPLK was up-regulated expressed by low temperature and CsPLK was down-regulated by drought. This study reveals that *CsPLK* had an obvious stress response in tea plants, suggesting that *CsPLK* played an important role in the growth and development of tea plants and the stress resistance.

Keywords: tea plant, gene identification, abiotic stress, tissue specificity

维生素 B_6（VB_6）是一类可以相互转换的吡啶类化合物的总称，包括吡哆醇（pyridoxine，PN）、吡哆胺（pyridoxamine，PM）、吡哆醛（pyridoxal，PL）以及它们相应的磷酸酯形式：磷酸吡哆醇（Pyridoxine-5’-phosphate，PNP）、磷酸吡哆胺（Pyridoxamine-5’-phosphate，PMP）和磷酸吡哆醛（Pyridoxal-5’-phosphate，PLP）。其中 PLP 是 140 多种酶的辅酶，涉及广泛的代谢和调节过程（Amadasi et al.，2007；Smolin & Benevenga，1982；Schulman & Richert，1957）。

植物是 VB_6 自养型生物，拥有“DXP 非依赖途径”（DXP independent pathway），以谷氨酰胺、5-磷酸-核糖（或 5-磷酸-核酮糖）和 3-磷酸-甘油醛（或磷酸二羟丙酮）为底物，在 PDX1 和 PDX2 构成的 PLP 合酶复合体的作用下，直接从头合成（*de novo* synthetic）PLP（Franco et al.，2001；Julliard JH & Douce R，1991）。除了 VB_6 的从头合成，植物体内还存在 VB_6 补救途径（salvage pathway）（Tanaka et al.，2005），该途径通过一系列酶的作用，实现不同 VB_6 的相互转化和 PLP 的补救合成，以及维持 VB_6 状态的稳定。PL 激酶（PL kinase，PLK）是 PLP 的补救合成途径重要的一种酶，PLK 在金属阳离子和 ATP 的存在下催化 PL 的磷酸化生成 PLP。2002、2004 和 2010 年，陆续从拟南芥（Lum et al.，2002）、小麦（Huabo et al.，2004）和油菜（Yu S & Luo L，2010）克隆出 PL 激酶基因，开启了从植物中研究 *PLK* 基因的热潮。

茶树（*Camellia sinensis*）是我国重要的经济作物，富含茶氨酸、儿茶素和咖啡碱等重要功能成分。VB_6 不仅在茶树的初生代谢和功能成分的生物合成过程中发挥重要作用，同时 VB_6 在植物体内参与逆境应答，但目前关于茶树中 VB_6 生物合成的鲜有报道。因此，研究茶树中 VB_6 补救途径中的 PL 激酶在茶树生长发育和逆境调控中的作用具有重要意义。本研究以茶树龙井 43 的 cDNA 为模板克隆出 PL 激酶基因，通过原核表达进行功能验证，并分析不同组织中的基因表达差异，同时设置干旱和低温胁迫分析 *CsPLK* 的逆境应答，为利用 VB_6 代谢调控提高茶叶品质和增强茶树抗性的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 茶树 *CsPLK* 的克隆与分析

实验材料为龙井 43 茶树幼苗，种植于安徽农业大学茶与食品科技学院实验分析平台。

使用全能型植物 RNA 提取试剂盒（康维世纪），提取茶树叶片、根和茎的总 RNA，用 Nanodrop ND 1000 检测 RNA 的浓度与纯度，1.0%凝胶电泳检测 RNA 质量。用 HifiScript cDNA 合成试剂盒（康维世纪）对上述总 RNA 样本进行反转录获得 cDNA。

以拟南芥 *PLK* 序列为模板，从中国科学院昆明植物研究所茶树基因组数据库中，通过比对获得候选序列并设计特异性引物，由安徽通用生物公司合成。上游引物：gGAATTCATGTCCGAGAAATTGACA；下游引物：gcTCTAGATTAGTTGTATCTCTCAGCC。下划线部分为 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切位点。

以上述 cDNA 为模板，建立扩增体系：Primer Star MIX 酶（TaKaRa 公司）12.5 μL、ddH_2O 9.5 μL、cDNA 模板 1 μL 、上下游引物各 1 μL。扩增条件：98 ℃预变性 5 min；98 ℃ 10 s，55 ℃ 15 s，72 ℃ 90 s，共 35 个循环；72 ℃ 10 min。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物，分离回收正确的 PCR 产物连接载体 pEasy-blunt（北京全式金生物有限公司），并转化到大肠杆菌 DH5α，命名为 pPLK，送至通用生物公司进行测序。

使用 ExPASy 网站的在线分析工具（http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool）分析蛋白的分子量和等电点；使用 DNAMAN 进行序列比对分析。

1.2 *CsPLK* 表达载体构建和功能鉴定

使用柱式质粒 DNA 提取试剂盒（Sangon Biotech）提取转化了 *CsPLK* 基因的 pPLK 菌株的质粒和 PET-22b（+）载体质粒，使用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *XbaI*（TAKARA）于 37 ℃分别进行双酶切 3 h，使用胶回收试剂盒（Sangon Biotech）回收双酶切之后的目的片段和载体片段，利用 T4 DNA 连接酶（TAKARA），于 16 ℃连接 16 h，连接产物转化到 Trans T1 大肠杆菌中，经菌液 PCR 验证后送至通用生物公司进行测序。

提取连接上 *CsPLK* 基因的 PET-22b(+)菌株质粒，转化至 Rosetta(DE3)(TransGen)表达菌株中，涂板过夜培养，挑取单菌落进行菌液 PCR 验证，选择验证正确的菌落加入 0.2 mmol/L IPTG，在 16 ℃诱导表达 24 h→4 ℃、4 000 rpm 离心 10 min→弃去上清，加入 PBS 重悬→超声波细胞破碎仪，5 s、3 s、破碎 99 次→4 ℃、12 000 g 离心 10 min，所得上清液即为粗酶液。将含有重组质粒 *pET-PLK* 的粗酶液命名为 Pro-CsPLK，含有空质粒 pET22b 的粗酶液命名为 Pro-22b。

采用Lum等（Lum et al.，2002）的方法，略做改动后测定CsPLK酶活，反应体系3 mL。向含有0.2 mmol/L PL、0.2 mmol/L ATP和0.1 mmol/L $ZnCl_2$的70 mmol/L磷酸钾缓冲液（pH 6.5）中，加入含0.5 mg Pro-CsPLK蛋白，37 ℃水浴反应30 min。添加高氯酸终止反应后12 000 g离心10 min，在上清中加入苯肼溶液并定容到3 mL。2.5 min时在410 nm处测定其吸光值为X，同时加入粗酶液和高氯酸的反应管中测定吸光值为Y，（X-Y）为每一组样品的最终吸光值。以Pro-22b代替Pro-CsPLK，其余条件相同，作为空白对照。

1.3 茶树 *CsPLK* 表达模式分析

以生长健壮、长势一致的1年生龙井43为材料，取生长在(25±1) ℃、含水率为（55±3）%的茶树幼苗的的嫩根、嫩茎、顶端第2~3片成熟叶进行组织表达差异性分析。参照Liu等（Liu SC，2015 & LIN et al.，2016）的方法进行低温（4 ℃）和干旱处理。调节人工气候室的温度使之维持在(4±1) ℃，实验组与对照组均为生长在温室(25±1) ℃中的茶树幼苗。对照组保持温室(25±1) ℃生长不变，实验组中的茶苗迅速移入低温气候室（4 ℃）中，其他环境条件保持不变，进行低温处理，分别在2、8、12、24、48 h时取茶苗上枝条顶端第2~3片成熟叶为材料；将茶树幼苗放置在（25±1） ℃的人工气候室中，实验组与对照组土壤含水率为（55±3）%，对照组浇水使土壤含水率维持在（55±3）%，实验组停止浇水，其他环境条件保持一致，进行干旱处理，分别在6、12 d时取样（顶端第2~3片成熟叶）后，给实验组浇水使其土壤含水率恢复至（55±3）%，在恢复6 d时取样（顶端第2~3片成熟叶），用于检测*CsPLK*在干旱胁迫后复水过程的表达模式。每个处理进行3次生物学重复。所有样品液氮速冻后保存于-80 ℃，提取RNA，检测*CsPLK*的表达模式。

采用荧光定量PCR（Quantitative Real-time PCR，QRT-PCR）测定*CsPLK*的表达，以*GAPDH*为内参基因。*CsPLK*的上游引物为AAGGTTGTCCCTGTTG，下游引物为TTGTGGGTGACGAATA。*GAPDH*的上游引物为TTGGCATCGTTGAGGGTCT，下游引物为

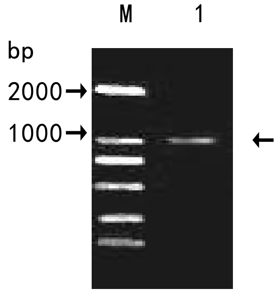
CAGTGGGAACACGGAAAGC。

使用 UltraSYBR Mixture 荧光定量试剂盒（康维世纪）进行荧光定量 PCR，30 μL 反应体系由 2xULtraSYBR 15 μL，正向引物 1.5 μL，反向引物 1.5 μL，cDNA 模板 1.5 μL，ddH_2O10.5 μL 构成，反应程序为 95 ℃ 10 min，95 ℃ 15 s，58 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s，循环数为 30。3 次技术重复，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算结果。(对照组和处理组之间的差异显著性采用 t 检验进行分析：* ：$0.01 \le P < 0.05$ ，**： $P < 0.01$）

2 结果与分析

2.1 茶树 *CsPLK* 基因的克隆

以拟南芥 *PLK* 的基因序列（NM_001344222）为模板，在茶树基因组数据库搜索比对得到一条相似性最高（57.86%），且含有完整编码框的基因序列。在 NCBI 分析该段序列发现第 37~343 位氨基酸是吡哆醛激酶功能域，属于核糖激酶超家族。随后设计克隆引物，以茶树总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模版，PCR 扩增得到一条清晰明亮的单一条带，大小约为 1 200bp（图 1），测序正确后，将此序列命名为 *CsPLK*，其编码框长 1179 bp，编码含有 393 个氨基酸残基的蛋白质，蛋白质的分子量为 43.9 kD，理论等电点 6.51（图 2）。



注：M. DNA Marker；1. *CsPLK*。

Note: M. DNA Marker；1. *CsPLK*.

图 1 *CsPLK* 的 PCR 扩增结果

Fig.1 The PCR result based on *CsPLK*

```
   1 M  S  E  K  L  T  F  S  G  E  T  F  K  E  N  F  Q  F  N  V  W  I  Y  V  S
   1 ATGTCCGAGAAATTGACATTTTCAGGTGAAACTTTCAAGGAAAATTTTCAATTCAATGTATGGATTTATGTTTCT
  26 I  H  T  I  L  K  I  L  L  T  E  C  C  R  L  R  S  S  K  K  S  V  M  A  P
  76 ATACATACCATTTTGAAGATTTTATTGACCGAATGTTGTAGGTTGAGAAGCTCGAAGAAGTCAGTAATGGCGCCG
  51 P  I  L  S  L  A  L  P  S  E  T  G  R  V  L  S  I  Q  S  H  T  V  Q  G  Y
 151 CCAATCCTTTCGCTAGCTTTGCCATCGGAAACGGGTCGAGTTCTCAGCATTCAATCTCACACTGTTCAGGGATAT
  76 V  G  N  K  S  A  V  F  P  L  Q  L  L  G  Y  D  V  D  P  I  N  S  V  Q  F
 226 GTCGGCAATAAATCAGCTGTTTTTCCTCTTCAACTTCTGGGCTATGATGTGGATCCAATCAATTCAGTGCAGTTC
 101 S  N  H  T  G  K  M  F  I  S  L  H  S  N  R  Y  P  T  F  K  G  Q  V  L  N
 301 TCGAACCATACAGGCAAGATGTTTATATCACTTCACTCAAACAGATACCCAACTTTCAAGGGGCAAGTTCTGAAT
 126 G  Q  Q  L  W  E  L  I  E  G  L  E  A  N  D  L  L  F  Y  T  H  L  L  T  V
 376 GGACAACAATTGTGGGAGTTAATAGAAGGCCTTGAAGCGAATGATTTATTATTCTATACTCATTTATTGACTGTT
 151 C  D  P  V  M  G  D  E  G  K  L  Y  V  P  P  E  L  V  A  V  Y  R  E  K  V
 451 TGTGATCCAGTAATGGGTGATGAAGGAAAGCTTTATGTCCCTCCAGAACTGGTAGCAGTATACCGTGAGAAGGTT
 176 V  P  V  A  S  M  L  T  P  N  Q  F  E  A  E  Q  L  T  G  L  R  I  V  S  E
 526 GTCCCTGTTGCTTCAATGTTGACTCCTAACCAATTTGAAGCAGAACAGTTGACTGGGTTAAGGATTGTGTCTGAA
 201 Q  D  G  L  E  A  C  N  I  L  H  A  A  G  P  P  K  N  K  A  N  I  D  D  L
 601 CAAGATGGCCTGGAAGCCTGCAACATTCTTCATGCTGCTGGACCACCAAAGAACAAAGCCAATATAGATGATCTG
 226 L  Q  A  G  R  P  Y  N  A  Q  P  E  C  C  W  V  K  G  R  V  K  S  N  L  D
 676 CTCCAAGCAGGCAGGCCTTATAATGCTCAGCCTGAGTGTTGCTGGGTAAAAGGGAGAGTCAAATCAAACTTAGAT
 251 R  C  F  L  E  N  L  D  N  V  E  T  G  H  N  V  K  F  F  V  F  F  Q  V  V
 751 CGCTGCTTTCTTGAGAATTTAGATAATGTGGAAACGGGACATAATGTGAAATTCTTTGTCTTTTTTCAGGTGGTG
 276 I  T  S  I  S  I  D  G  N  L  R  L  I  G  S  H  Q  K  E  K  G  Q  S  P  E
 826 ATAACTAGCATAAGTATTGATGGCAATCTTCGTCTAATTGGCAGTCATCAAAAAGAAAAGGGTCAATCACCTGAG
 301 Q  F  K  I  M  I  P  K  I  P  A  Y  F  T  G  T  G  D  L  M  T  A  L  L  L
 901 CAGTTCAAGATTATGATACCCAAAATTCCTGCATATTTCACGGGTACAGGAGATCTAATGACTGCACTATTACTT
 326 G  W  S  N  K  Y  P  N  N  L  D  K  A  A  E  L  A  V  S  S  V  Q  A  L  L
 976 GGATGGAGCAATAAATATCCCAACAATCTTGACAAAGCAGCAGAGCTTGCTGTATCAAGCGTGCAGGCACTTCTG
 351 L  R  T  L  N  D  Y  K  A  A  G  Y  D  P  Q  S  S  S  L  E  I  R  L  I  Q
1051 CTGAGGACACTGAATGACTACAAAGCAGCTGGCTATGATCCTCAATCAAGCAGTTTGGAAATTCGATTAATTCAG
 376 S  Q  D  D  I  R  H  P  Q  V  K  Y  K  A  E  R  Y  N  *
1126 AGCCAAGACGATATTCGTCACCCACAAGTTAAATACAAGGCTGAGAGATACAACTAA
```

图 2 *PLK* 核酸序列及氨基酸序列

Fig.2 *PLK* nucleic acid sequences and amino acid sequences

2.2 茶树 *CsPLK* 的序列分析

使用 DNAMAN 构建 *CsPLK* 在原核表达中的图谱（图 3）。将 *CsPLK* 与其他植物中的 *PLK* 进行列比对（图 4）。发现 *CsPLK* 与植物的 *PLK* 序列具有高度的一致性，与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、油菜（*Brassica napus*）、大豆（*Glycine max*）、烟草（*Nicotiana tabacum*）、小麦（*Triticum aestivum*）和玉米（*Zea mays*）*PLK* 的一致性分别为 77.39%，79.71%，76.23%，82.95%，71.30%和 71.59%，有很高的亲缘性。

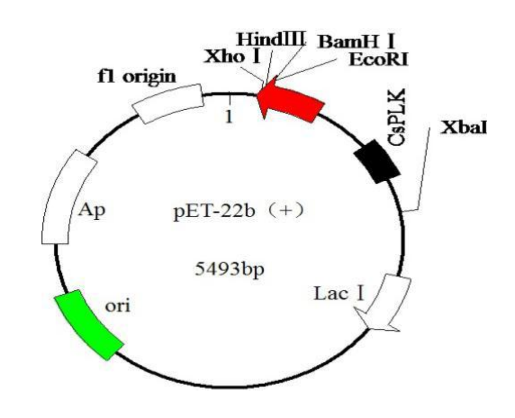
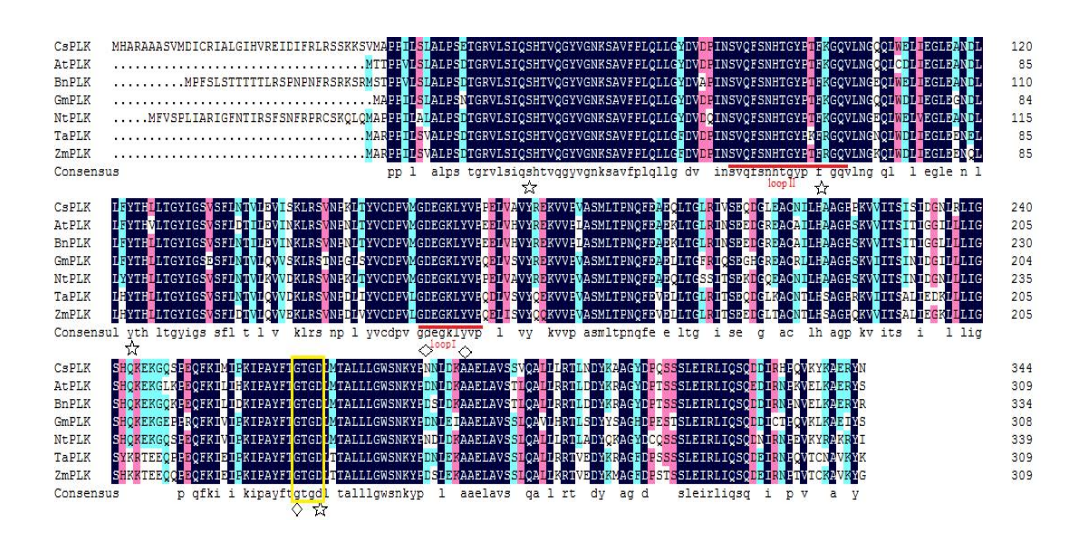


图 3 *CsPLK* 在原核表达中的图谱

Fig.3 Mapping of prokaryotic expression of *CsPLK*



注：茶树 PLK、拟南芥 PLK（26397694）、 油菜 PLK（92111351）、大豆 PLK（68131817）、烟草 PLK（85068609）、小麦 PLK（304561310）、玉米 PLK（226502934）。

图中☆、◇表示两种不同的活性位点；红色划线部分为 loopI、loopⅡ；黄色方框是 GTGD 基序

Note:*Camellia sinensis* PLK, *Arabidopsis thaliana* PLK（26397694）, *Brassica napus* PLK（92111351）, *Glycine max* PLK（68131817）, *Nicotiana tabacum* PLK（85068609）, *Triticum aestivum* PLK（304561310）, *Zea mays* PLK（226502934）.

☆and ◇ represent two different binding sites; Red line part is loopI, loop Ⅱ; Yellow box is the GTGD motif.

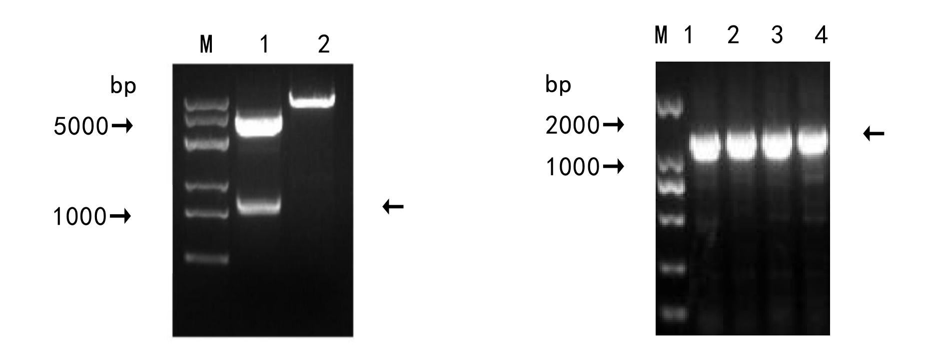
图 4 茶树与其它物种中 *PLK* 多序列比对

Fig 4 _Comparison of *PLK* amino acid sequences in tea and other species

2.3 *CsPLK* 基因原核表达载体构建

使用 *EcoRI* 和 *XbaI* 限制性内切酶对含有目的基因的 pPLK 载体和 pET22b（+）载

体进行双酶切（图 5）。使用 T4 连接酶 16 ℃连接目的基因与载体片段，转化至 Trans T1 大肠杆菌中，涂板过夜培养，进行菌落 PCR 验证，可以看出目的基因成功连接至 pET22b（+）载体上（图 6）。



注：M. DNA Marker；1. *CsPLK*；2. pET22b（+）载体。

Note: M. DNA Marker；1. *CsPLK*；2. pET22b(+) vector.

图 5 *CsPLK* 片段与载体双酶切

Fig.5 *CsPLK* fragment and vector double enzyme

注：M. DNA Marker；1-4. 分别为不同的单菌落。

Note: M. DNA Marker；1-4. different single colonies.

图 6 *CsPLK* 菌落 PCR 验证

Fig.6 Colony PCR verification by *CsPLK*

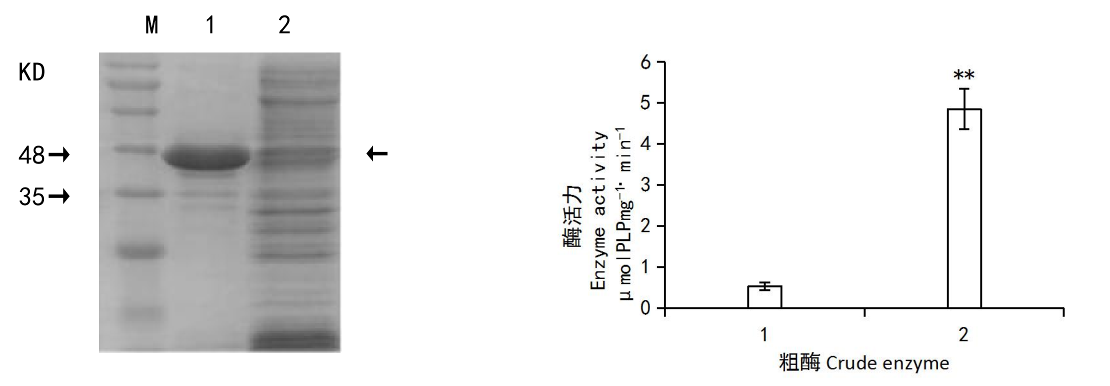
2.4 CsPLK 蛋白的诱导表达

采用 T7 启动子/T7 RNA 聚合酶表达系统 pET22b（+）-Rosetta（DE3）对 *CsPLK* 在大肠杆菌中进行蛋白表达。在 IPTG 的诱导下，插入 T7 启动子后的编码区能够在表达菌株 Rosetta（DE3）中被高效转录。原核表达产物经 SDS-PAGE 凝胶电泳显示，成功的在 45 KDa 附近诱导出了目的蛋白，且在上清中大量表达，与预测蛋白大小一致（图 7）。

2.5 CsPLK 的酶活测定及部分酶学性质分析

以 PL 为底物，在 pH 6.5 和 37 ℃条件下，对原核表达的重组茶树 PL 激酶进行功能鉴定。结果表示，pro-CsPLK 的酶活力约为 4.853 μmolPLP·mg^{-1}·min^{-1}，对照组 pro-22b 约为 0.529 μmolPLP·mg^{-1}·min^{-1}，pro-CsPLK 酶活力是对照的 9.17 倍（图 8）。表明 CsPLK 具有较强的 PL 激酶活性，原核表达的蛋白确为茶树 PLK 蛋白。

PL 激酶在金属阳离子存在下才能催化反应，pH 值是影响酶活性的一个非常重要的因素，所以对 PL 激酶的最适的金属离子及 pH 值进行测定。显示该酶的最适 pH 大约在 6.4 左右（图 9），Zn^{2+}的催化活性最强（图 10）。



注：M. DNA Marker；1. *CsPLK* 上清；2. *CsPLK* 沉淀。

Note：M. DNA Marker；1. CsPLK supernatant；2. CsPLK precipitation.

注：1. pro-22b；2. pro-CsPLK。

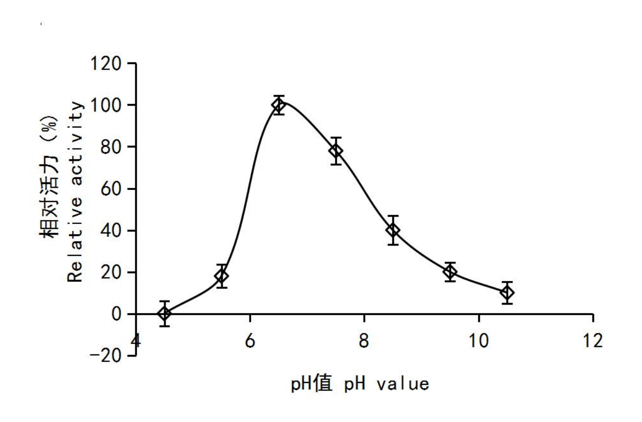
Note：1. pro-22b；2. pro-CsPLK.

图 7 *CsPLK* 的 SDS-PAGE 结果

Fig.7 SDS-PAGE results of *CsPLK*

图 8 酶促反应活性的测定

Fig.8 Determination of enzymatic activity



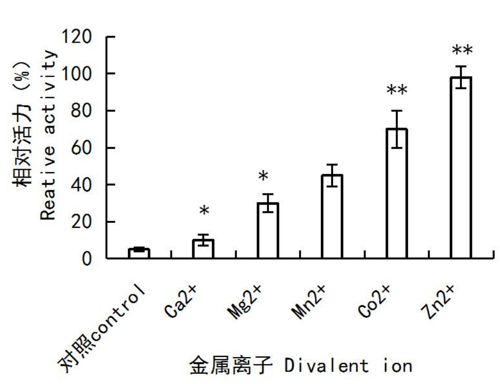


图 9 pH 值对 *CsPLK* 活性的影响

Fig. 9 Effect of pH on *CsPLK* activity

图 10 金属离子对 *CsPLK* 活性的影响

Fig. 10 Effect of divalent ion on *CsPLK* activity

2.6 *CsPLK* 的组织表达差异性分析

采取荧光定量 PCR 对茶树根、嫩茎、嫩叶进行分析，结果显示，在茶树叶片组织中 *CsPLK* 的表达量最高，茎和根中的表达量相似，约为叶片组织的四分之一（图 11）。

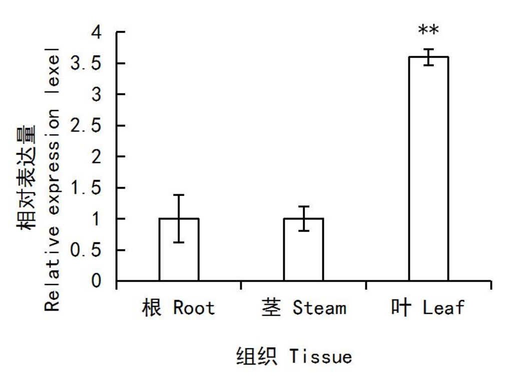
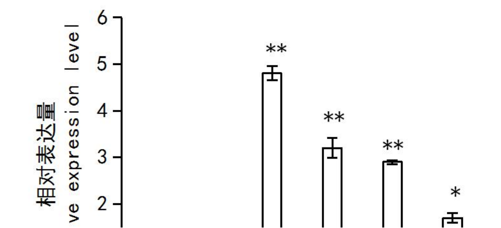


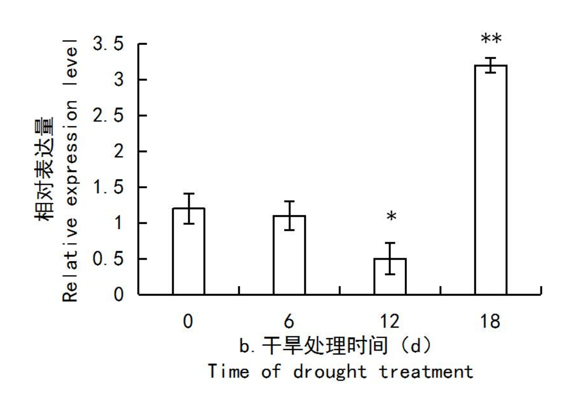
图 11 茶树各组织中 *CsPLK* 基因的表达

Fig.11 Expression of *CsPLK* genes in tea tissues

2.7 逆境条件下 *CsPLK* 基因的表达情况

低温胁迫处理 48 h 过程中，*CsPLK* 表达先上升，在处理 8 h 时到达顶点后逐渐下调，但仍高于未处理前的水平（图 12a）。干旱胁迫处理后，*CsPLK* 表达量下降，12d 时表达量降到最低，复水后第 6 d 表达量上升，且高于干旱处理前水平（图 12b）。表明 *CsPLK* 参与茶树对低温和干旱胁迫的响应，但其在两种胁迫下表达模式不同。





注: a. 低温胁迫；b.干旱胁迫

Note: a. temperature stress；b. drought stress

图 12 逆境胁迫下茶树 *CsPLK* 基因的表达

Fig.12 Expression of *CsPLK* under adversity stress in tea leaf

3 讨论

本研究利用已知的拟南芥 PLK 的基因序列为模板，在茶树基因组数据库中比对得到一条相似性最高（57.86%）的为候选茶树 PLK 序列，其编码的氨基酸序列含有一个典型的吡哆醛激酶功能域，属于核糖激酶超家族的成员。利用 PCR 技术茶树龙井 43 中克隆出 PLK 基因，命名为 *CsPLK*。多序列的同源比对结果表明，*CsPLK* 与拟南芥、烟草、大豆等植物类中的 *PLK* 氨基酸序列相似性达到 70%以上，有很强的亲缘性。*CsPLK* 的 Asp151、Tyr161、Gly313（图 4▲处）和阴离子孔基序 GTGD（Gly313-Asp3171）与已经证实的 *PLK* 的 ATP 结合位点完全一致，这几个氨基酸残基高度保守，三个 ATP 磷酸基团通过由高度保守的序列基序 GTGD 和附近螺旋 N 末端形成的阴离子孔以及结合需要的金属阳离子，促进氢键与蛋白质残基互相作用，使 *PLK* 活性位点的空间结构更稳定，从而提高 *PLK* 活性（Kim MI & Hong M，2016）。1970、1998、1999、2002 年，分别对牛（Neary JT & Diven WF，1970）、猪（Gao ZG et al.，1998）、羊（Maras B et al.，1999）和拟南芥（Lum et al.，2002）的 PLK 进行酶动力学研究时，得出 Zn^{2+} 是 PLK 发挥活性作用的最适金属离子，本研究通过在不同的二价金属离子测定酶活性，发现活化效率依次是 $Zn^{2+}> Co^{2+}>Mn^{2+}> Mg^{2+}> Ca^{2+}$，得出 PL 激酶在 Zn^{2+}离子存在下的催化活性最强，与前人结论一致。*CsPLK* 的 Ser 68、Thr 103、Tyr143 和 Asp317（图 4★处）与已经验证的与 PL 形成氢键相互作用的氨基酸残基一致，这些氨基酸残基也高度保守，决定底物特异性（Scholz G & Kwok F, 1989）。茶树中的 *CsPLK* 和其他物种 *PLK* 一样具有高度保守的与功能密切相关的 loopI 和 loopⅡ结构，*CsPLK* 的 loopI 结构为 Gly155-Val162，与大多数植物和微生物长度一致，为 8 个氨基酸，而高等动物为 12 个氨基酸，loopI 对防止 ATP 无效的水解，以及在保护和促进底物结合方面有重要作用，至于不同物种中 loopI 的氨基酸不同，是否与生物进化有关目前还尚不清楚，需要进一步的实验研究；*CsPLK* 的 loopⅡ区域在植物中高度保守，与酶的底物特异性和底物亲和力有关（Campobasso N et al., 2000；Cheng G et al., 2002）。

本研究通过构建原核表达载体以及体外酶活测定，得出茶树中的 CsPLK 在 pH 值为 6.4 和金属阳离子为 Zn^{2+}时有很强的催化活性，催化 PL 的磷酸化生成 PLP，表明原核表达产物为 CsPLK 蛋白。通过对茶树体内 *CsPLK* 的组织差异性分析，发现在茶树的叶、茎、根中均有表达，并且在叶片中表达量最高，推测可能与叶片中含有丰富的叶

绿体有关。植物有 VB_6 的从头合成途径，利用 DXP 非依赖途径直接合成 PLP 从而被细胞利用，合成的场所是细胞质，叶绿体中可能是通过 PLP 的补救途径来合成 PLP，而 PL 激酶是 PLP 补救途径中的关建酶，所以 PL 激酶基因在茶树的叶片中的表达量比较高。

越来越多的研究说明植物 *PLK* 基因的表达受各种生物或非生物胁迫的影响，从而参与植物的逆境应答，其中拟南芥中的 PL 激酶基因的表达在冷胁迫下显著增加（Lum et al.，2002），甘蓝型油菜中的 PL 激酶的表达受低温诱导（Yu S & Luo L，2010），小麦中的 PL 激酶基因表达不受渗透胁迫的调节（Huabo et al.，2004）。在本研究中，茶树 *CsPLK* 基因受低温胁迫后能够快速诱导表达，即使在低温处理的 48h 后依然高于未处理前表达量；在干旱胁迫下主要表现为抑制，但复水后能够快速诱导植物进行响应，且此期间的 *CsPLK* 具有较高的转录水平，干旱后复水响应也是植物抗旱机理研究中重要的内容之一。以上结果表明，茶树中 *CsPLK* 与低温、干旱逆境胁迫响应密切相关，同时可以得出 *CsPLK* 在不同物种间的逆境应答有明显的差异性。

本研究对茶树中 VB_6 补救合成途径中的 *CsPLK* 基因进行了初步的鉴定与表达分析，得出 *CsPLK* 参与低温和干旱逆境逆境应答，此研究结果为利用 VB_6 代谢调控来提高茶树抗性从而提高茶树品质的应用研究奠定了基础，也充实了植物抗性生理的研究。后续可通过克隆茶树上 VB_6 补救途径的其他基因来全面研究 VB_6 在茶树逆境应答中的作用。

参考文献

AMADASI A, BERTOLDI M, CONTESTABILE R, et al., 2007. Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents[J]. Curr Med Chem, 14(12): 1291-1324.

CAMPOBASSO N, MATHEWS II, BEGLEY TP, et al., 2000. Crystal structure of 4-methyl-5-beta-hydroxyethylthiazole kinase from Bacillus subtilis at 1.5 A resolution[J]. Biochem, 39(27):7868-7877.

CHENG G, BENNETT EM, BEGLEY TP, et al., 2002. Crystal Structure of 4-Amino-5-Hydroxymethyl-2- Methylpyrimidine Phosphate Kinase from Salmonella typhimurium at 2.3 Å Resolution[J]. Struct, 10(2):225-235.

FRANCO MG, LABER B, HUBER R, et al., 2001. Structural Basis for the Function of Pyridoxine 5′-Phosphate Synthase[J]. Struct, 9(3):245-253.

GAO ZG, LAU CK, LO SC, et al., 1998. Porcine pyridoxal kinase c-DNA cloning, expression and confirmation of its primary sequence[J]. Int J Biochem & Cell Biol, 30(12): 1379-1388.

HAO S, 2013. The qrt-pcr under different stress conditions was suitable for the selection of internal reference genes[D].Nanjing: Nanjing Agric Univ. [郝姗,2013. 茶树不同逆境条件下 QRT-PCR 适宜内参基因的筛选[D]. 南京：南京农业大学.]

HUABO W, DONG CL, CHUN GL, et al., 2004. The pyridoxal kinase gene TaPdxK from wheat complements vitamin B6 synthesis-defective Escherichia coli[J]. J Plant Physiol, 161(9):1053-1060.

JULLIARD JH, DOUCE R, 1991. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts[J]. Proc Int Acad Sci, 88(6):2042-2045.

KIM MI, HONG M, 2016. Crystal structure and catalytic mechanism of pyridoxal kinase from Pseudomonas aeruginosa[J]. Biochem & Bioph Res Commun, 478(1):300-306.

LIN ZH, ZHONG QS, SHANG RY, et al., 2016. Expression analysis of cold resistance genes CsCBF1 and CsICE1 in tea plants at low temperature[J]. J Nucl Agric Sci, 30(9):1693-8. [林郑和，钟秋生，单睿阳，等，2016. 茶树抗寒基因 CsCBF1 与 CsICE1

低温下的表达分析[J]. 核农学报，30(9):1693-1698.]

LIU SC, 2015. Physiological and molecular mechanisms of response to drought stress and rehydration of tea plants[D].Beijing: Chin Acad Agric sci.[刘声传, 2015. 茶树对干旱胁迫和复水响应的生理、分子机理[D]. 北京：中国农业科学院.]

LUM HK, KWOK F, LO SC et al., 2002. Cloning and Characterization of Arabidopsis thaliana pyridoxal kinase [J]. Plant, 215: 870-879.

MARAS B, VALIANTE S, ORRU S, et al., 1999. Structure of pyridoxal kinase from sheep brain and role of the tryptophanyl residues[J]. J Protein Chem, 18(3): 259-268.

NEARY JT, DIVEN WF, 1970. Purification, properties, and a possible mechanism for pyridoxal kinase from bovine brain[J]. J Biol Chem, 245(21):5585-5593.

NIU TT, ZHANG JY, HUANG LONGQUAN, et al., 2010. Activity analysis of vitamin B6 metabolic enzyme PLK in fresh tea leaves [J]. J Tea Sci, 30(4):269-272. [钮甜甜， 张剑韵，黄龙全，2010. 茶树鲜叶中维生素 B6 代谢酶 PLK 的活性分析[J]. 茶叶科学, 30(4):269-272.]

SCHOLZ G, KWOK F, 1989. Brain pyridoxal kinase: photoaffinity labeling of the substrate-binding site[J]. J Biol Chem, 264(8):4318-4321.

SCHULMAN MP, RICHERT DA, 1957. Heme synthesis in vitamin B6 and pantothenic acid deficiencies[J]. J Biol Chem, 226(1):181-189.

SHI H, ZHU JK, 2002. SOS4, A Pyridoxal Kinase Gene, Is Required for Root Hair Development in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 129(2):585-593.

SMOLIN LA, BENEVENGA NJ, 1982. Accumulation of homocyst(e)ine in vitamin B6 deficiency: a model for the study of cystathionine beta-synthase deficiency[J]. J Nutrition, 112(7):1264-1272.

TANAKA T, TATENO Y, GOJOBORI T et al., 2005. Evolution of vitamin B6 (pyridoxine) metabolism by gain and loss of genes[J]. Mol Biol & Evolution, 22(2):243-250.

WANG Hb, LIU DC, LIU CG, et al., 2004. The pyridoxal kinase gene TaPdxK from wheat complements vitamin B6 synthesis-defective Escherichia coli[J]. J Plant Physiol, (161) 1053—1060.

YU S, LUO L, 2010. Expression analysis of a novel pyridoxal kinase messenger RNA splice variant, PKL, in oil rape suffering abiotic stress and phytohormones[J]. Acta Biochim Et Biophys Sinica, 40(12):1005-1014.